

# Posible relación de la quinasa ligada a integrinas (ILK) con el receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR) en la sarcopenia asociada a la Enfermedad renal crónica (ERC)

Sergio García-Villoria<sup>1,2</sup>, Alba Silvestre-Vargas<sup>1,2</sup>, Marta Vázquez-Duro<sup>1,2</sup>, Mercedes Griera-Merino<sup>1,3</sup>, María Martos-Elvira<sup>1,2</sup>, Ariadna Moreno-Piedra<sup>1,2</sup>, Patricia Martínez-Miguel<sup>4</sup>, Sergio de Frutos-García<sup>1,2</sup>, Diego Puyol-Rodríguez<sup>2,4,5</sup>, Laura Calleros-Basilio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá; Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Madrid

<sup>2</sup> Instituto Ramon y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), RICORS2040-RENAL de Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), INNOREN-CM, Madrid

<sup>3</sup> Graphenano Medical Care S.L., Alcalá de Henares

<sup>4</sup> Unidad de Nefrología, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares

<sup>5</sup> Departamento de Medicina y especialidades médicas, Universidad de Alcalá, Fundación para la investigación biomédica Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Madrid

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En las etapas avanzadas de la enfermedad renal crónica (ERC) un 25% de los pacientes padecen sarcopenia, entendido como la pérdida de masa y funcionamiento muscular. El receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) actúa como un factor transcripcional y puede ser activado por toxinas urémicas acumuladas durante ERC, como el indoxil sulfato (IS). AhR está vinculado con la degeneración muscular y podría ser un vínculo entre sarcopenia y ERC, aunque el mecanismo de traslocación de AhR al núcleo en condiciones urémicas no está completamente elucidado. La quinasa ligada a integrinas (ILK) es un posible candidato por ser una proteína fundamental para la organización y funcionalidad del citoesqueleto, y la fosforilación de ciertas proteínas. Aquí utilizamos un modelo in vivo de ERC y modelos in vitro de células de músculo esquelético, para analizar el posible papel de ILK en la traslocación nuclear del AhR y en los consecuentes cambios de marcadores de diferenciación miogénica y de transdiferenciación del músculo esquelético durante la sarcopenia asociada a la ERC.

## METODOLOGÍA

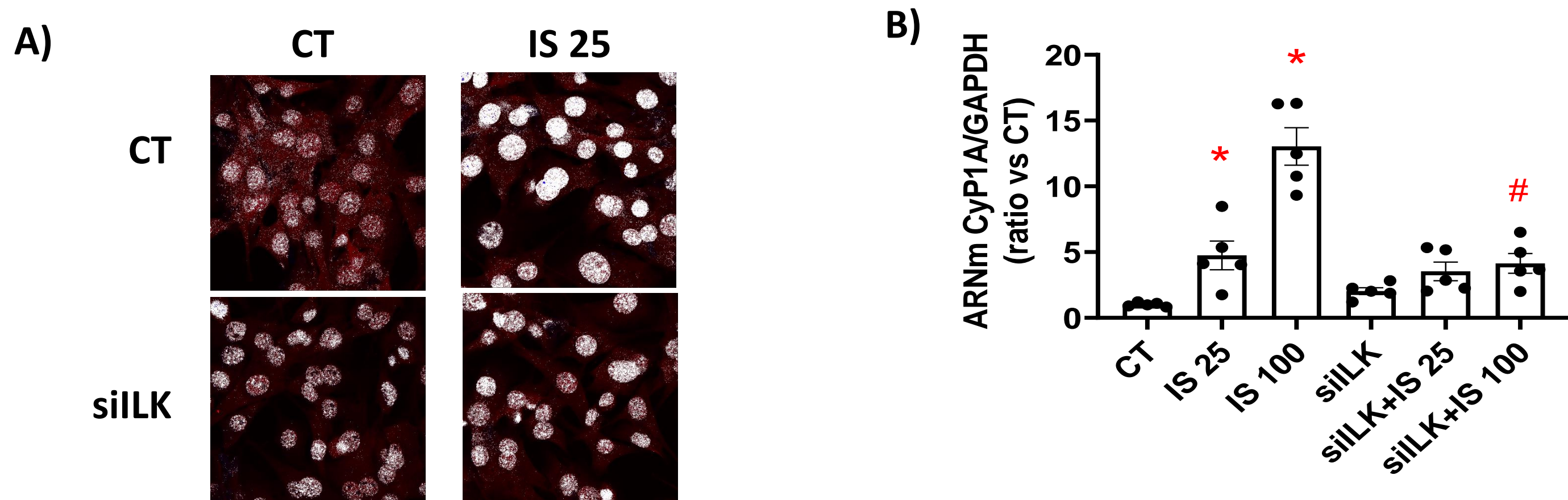
*In vitro*: se cultivaron mioblastos C2C12 tratados con 25 o 100 µg/ml Indoxil sulfato (IS25 o IS100), con y sin silenciamiento de ILK mediante la transfección de RNAs de interferencia específicos (siRNA-ILK) o inespecíficos en los controles (CT) por 24 h previo a los tratamientos.

*In vivo*: ratones con delección condicional de ILK (cKD-ILK) o sus controles (WT) sometidos o no a dieta rica en adenina (A, 0.2%) durante 2 y 4 semanas (A2wk y A4wk, respectivamente) como modelo ERC (PMID: 30726718). Se realizaron pruebas de fuerza de agarre (PMID: 34337906) y se recolectaron sus gastrocnemios al final del experimento, para posteriormente analizar mediante técnicas de biología celular: Western Blot, RT-qPCR e inmunofluorescencia utilizando sondas y anticuerpos específicos. La polimerización de actina se detectó con la sonda fluorescente Faloidina y los núcleos fueron teñidos con DAPI. Análisis estadístico mediante Anova.

## Resultados

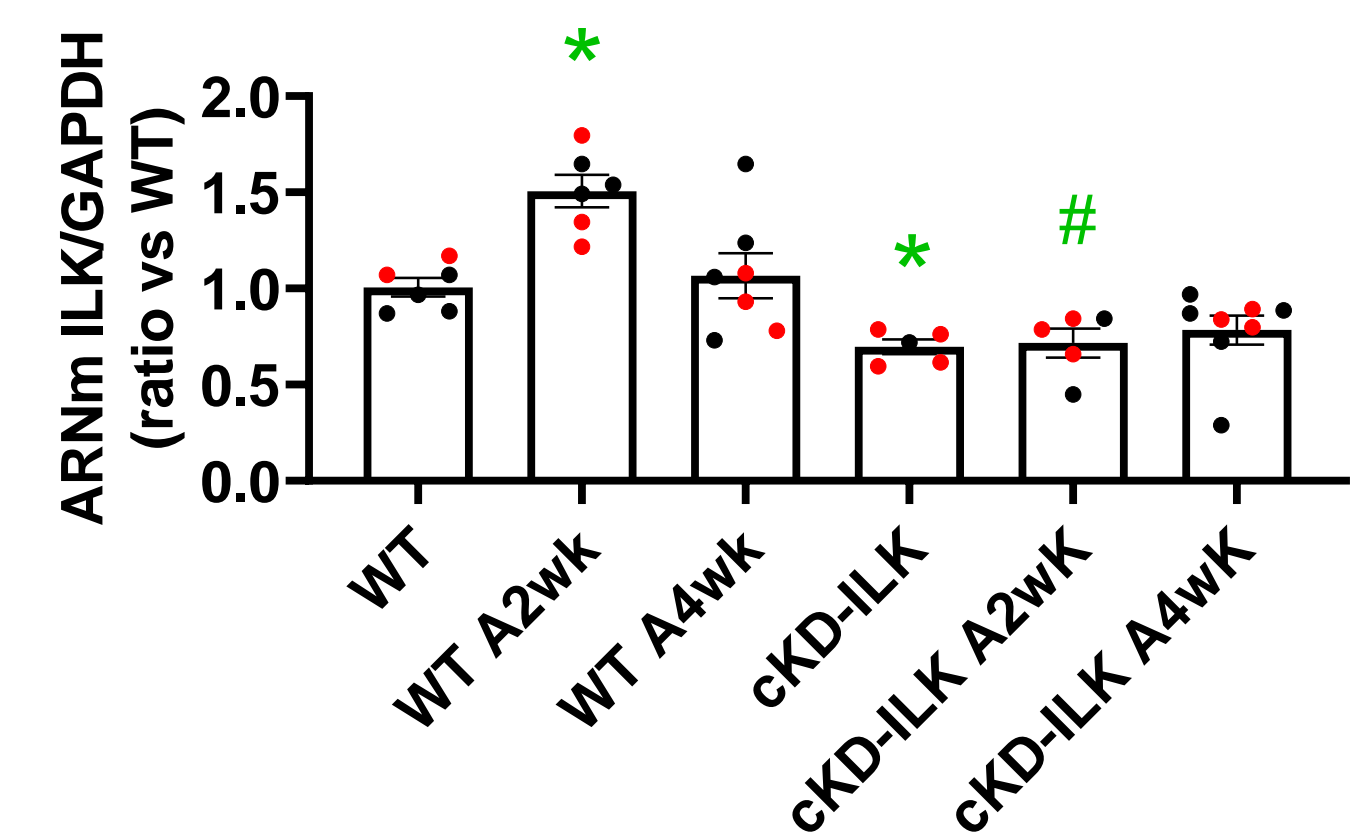
IS aumentó la traslocación al núcleo y la actividad de AhR en C2C12, medida por un aumento en la expresión de su efector CyP1A1. El mecanismo implica la fosforilación de substratos de ILK y la polimerización de actina. Constatamos la participación de ILK en estos procesos porque su silenciamiento redujo la polimerización de actina e impidió el aumento de CyP1A1. Respecto a las consecuencias funcionales, IS redujo la expresión de factores de diferenciación miogénica (MyoD y MyoG) y aumentó marcadores adipocitarios (FABP4 y PPAR $\gamma$ ). La delección de ILK revirtió estos marcadores de diferenciación y transdiferenciación. En el modelo in vivo de ERC, la expresión de ILK y CyP1A1 aumentó en los gastrocnemios de los animales y se redujo la fuerza muscular, en tanto que en los cKD-ILK se preservó la fuerza y disminuyó la expresión de CyP1A1.

### In vitro

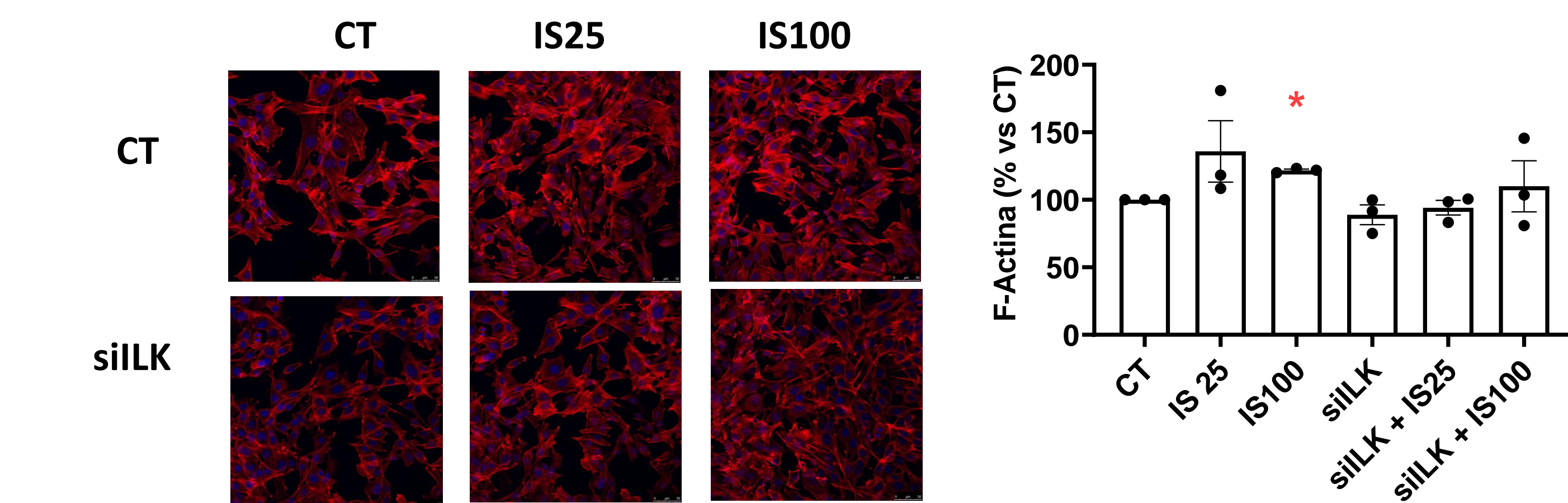


**Figura 1. El silenciamiento de ILK reduce la traslocación de AhR y la expresión de su efector CyP1A1 causado por IS.** Mioblastos transfectados con siRNAs de ILK (siILK) o inespecíficos (CT) tratados IS 25 o 100 µg/ml. A) Imágenes representativas de confocal que muestran co-localización (blanco) de AhR (rojo) en el núcleo (azul) a los 30 minutos de tratamiento. B) expresión de ARNm de CyP1A1 normalizadas vs GAPDH como endógeno tras 48 h de tratamiento. Media  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05 vs CT; # $p$ <0.05 vs IS.

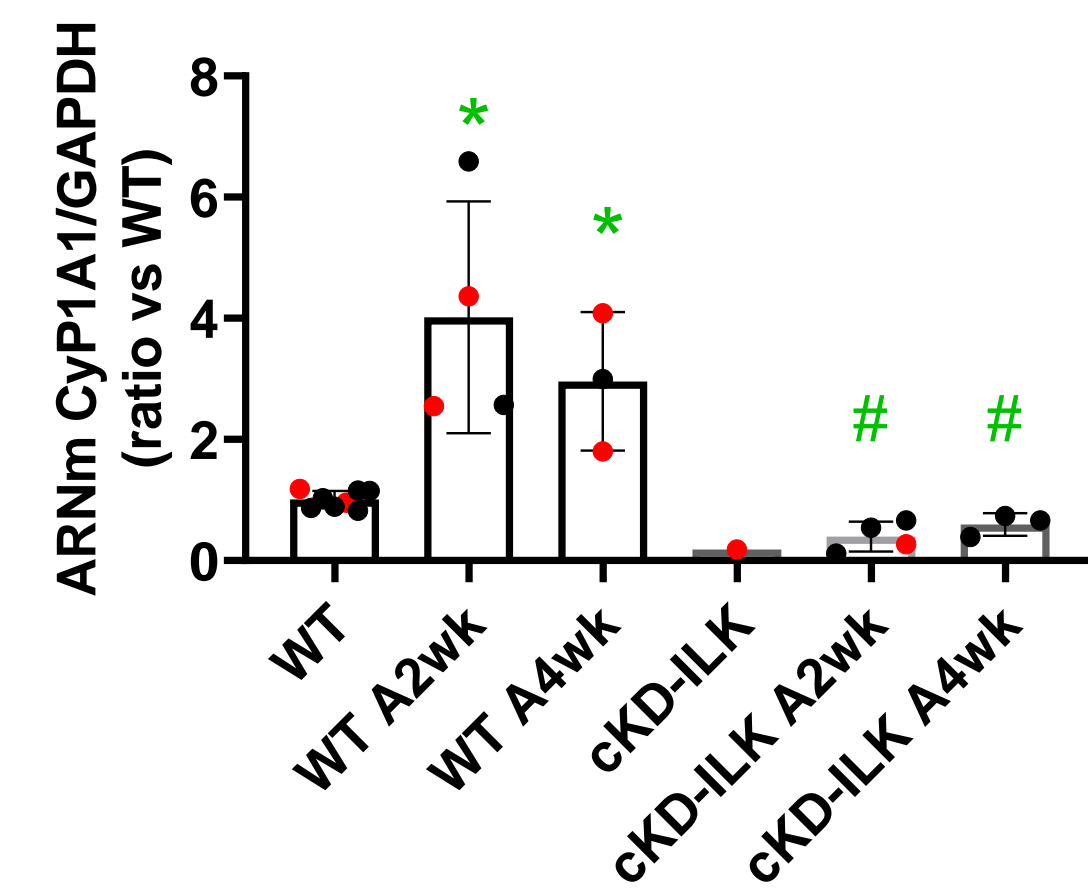
### In vivo



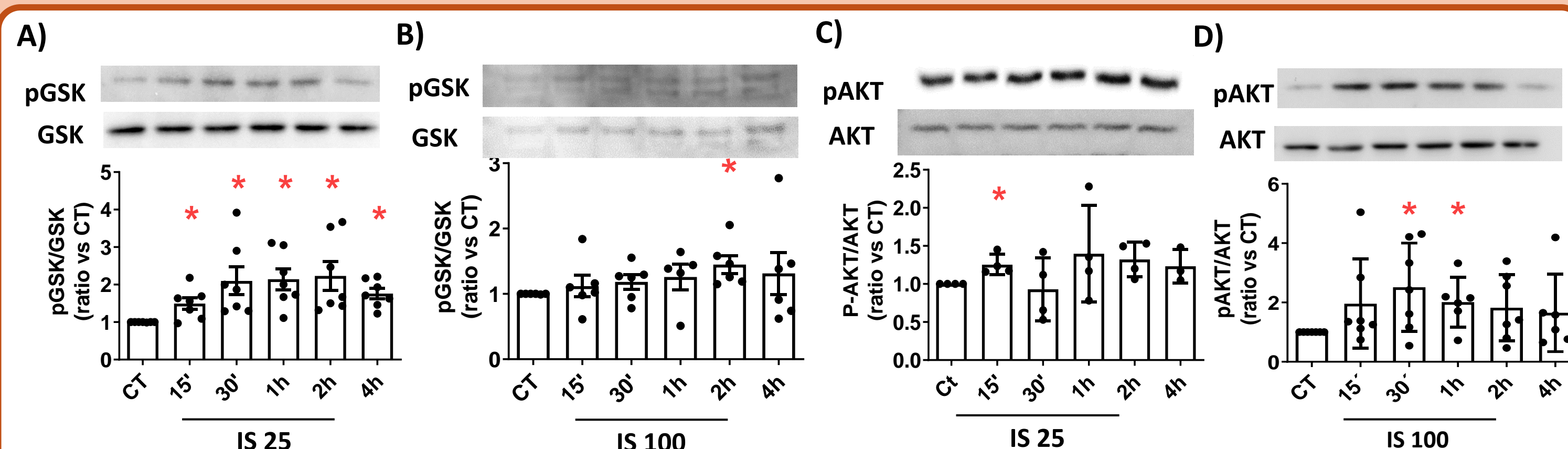
**Figura 5. La ERC induce el aumento de expresión de ILK en el músculo esquelético.** La expresión de ARNm de ILK en el gastrocnemio se evaluó por RT-qPCR, se normalizó vs GAPDH como endógeno. Círculos rojos=hembras. Círculos negros=machos. Media  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05 vs WT; # $p$ <0.05 vs WTA



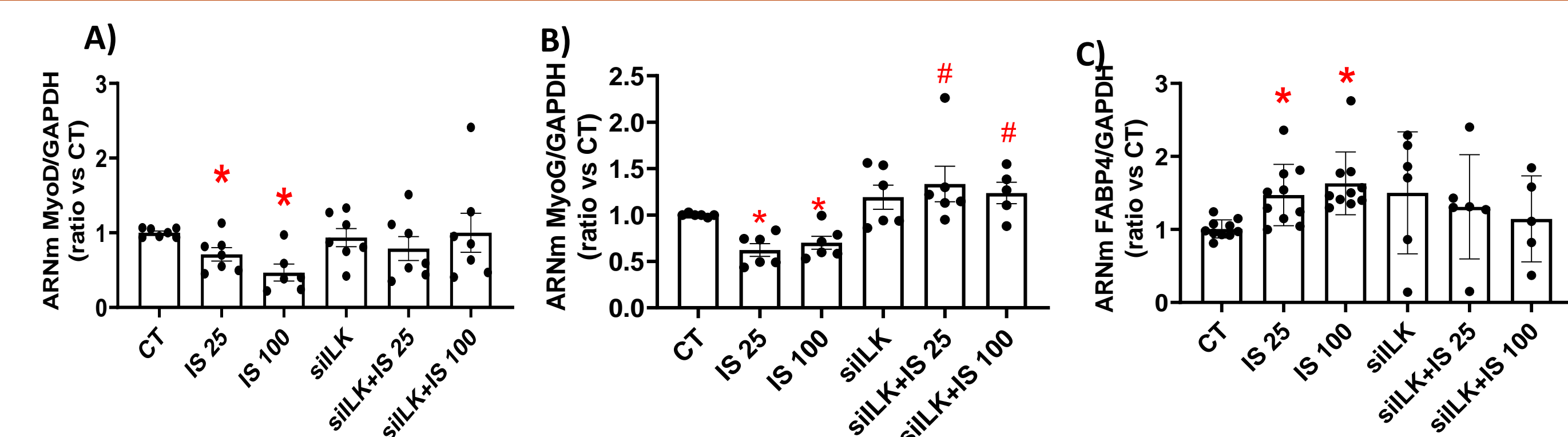
**Figura 2. El silenciamiento de ILK disminuye la polimerización del citoesqueleto de actina causado por IS.** Imágenes representativas de confocal de la polimerización de F-actina (faloidina rojo) y núcleos (DAPI, azul) en mioblastos C2C12 transfectados con siRNAs de ILK (siILK) o inespecíficos (CT) y tratados con IS 25 o 100 µg/ml. Media  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05 vs CT.



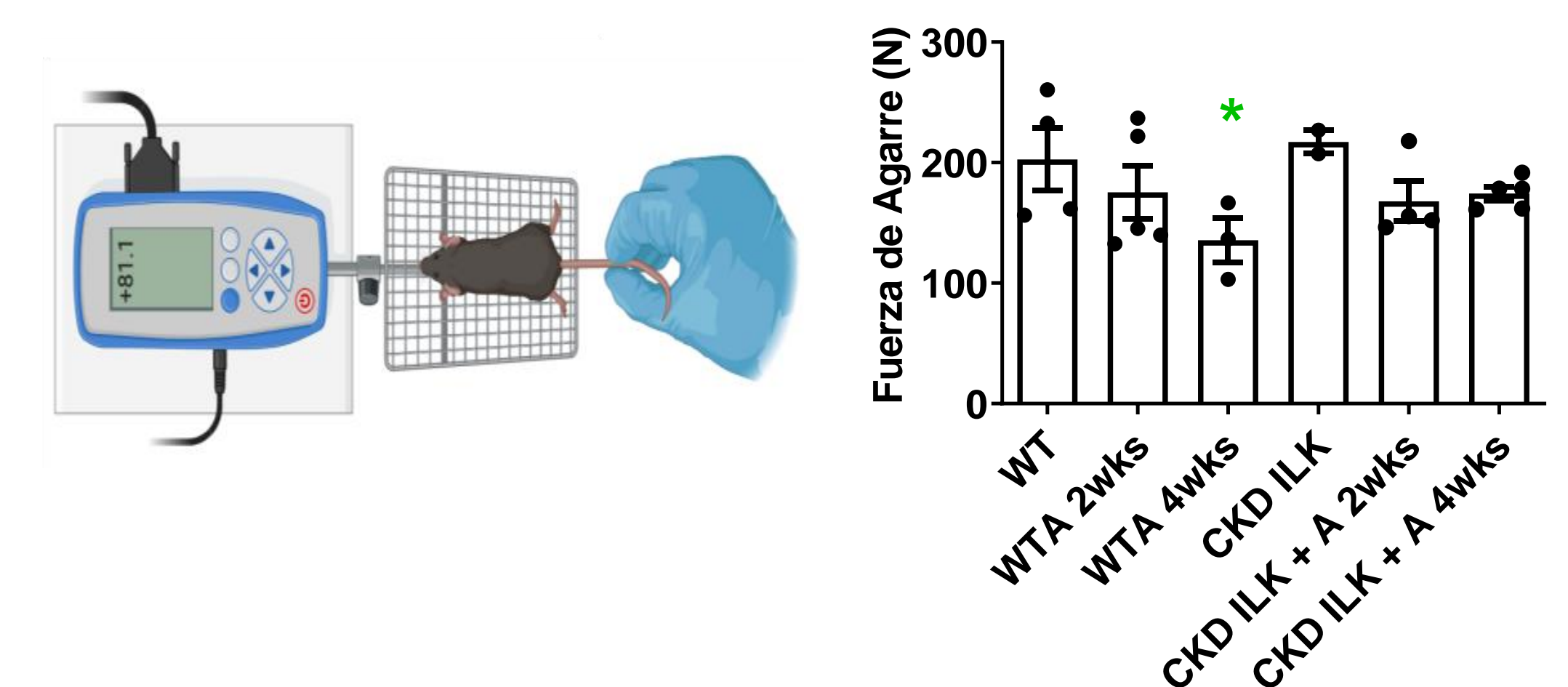
**Figura 6. La delección condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético reduce la actividad de AhR causada por ERC.** La expresión en el gastrocnemio de ARNm del efector de AhR, CyP1A1 se normalizó vs GAPDH como endógeno. Círculos rojos= hembras. Círculos negros= machos. Media  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05 vs WT, ; # $p$ <0.05 vs WTA



**Figura 3. El IS induce la actividad de ILK sobre sus sustratos GSK y AKT.** Niveles proteicos de GSK-3 $\beta$  fosforilado en ser9 (pGSK) vs total (GSK) en células tratadas con IS 25 o 100 µg/ml (A y B respectivamente) y AKT fosforilado en ser473 (pAKT) vs total (AKT) en células tratadas con IS 25 o 100 µg/ml (C y D, respectivamente). Media  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05 vs CT.



**Figura 4. El silenciamiento de ILK revierte los cambios de expresión de marcadores de diferenciación muscular y transdiferenciación adipocitaria causados por IS.** Niveles de expresión ARNm de marcadores de diferenciación miogénica A) MyoD y B) MyoG, y de transdiferenciación adipocitaria C) FABP4, en mioblastos C2C12 transfectados con siRNAs de ILK (siILK) o inespecíficos (CT) y tratados con IS 25 o 100 µg/ml. Media  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05 vs CT; # $p$ <0.05 vs IS.



**Figura 7. La delección condicional de ILK (cKD-ILK) en músculo esquelético previene la pérdida de fuerza de agarre causada por ERC.** Prueba de fuerza de agarre medida en Newtons (N). Círculos negros=machos. Media  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05 vs WT.

## Conclusiones

Sugerimos un posible eje ILK–AhR involucrado en el daño muscular inducido por toxinas urémicas, susceptible de ser modulado para prevenir la sarcopenia durante la ERC.

**FINANCIACIÓN:** Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Comunidad de Madrid (CAM), Universidad de Alcalá and FEDER funds (PI20/00634, PI20/00664, PI22/01714, PI23/01071, P2022/BMD7221, B2017/BMD3751, 2025/00041/001); Contrato predoctoral ISCIII a S.G.-V. (FI24/00014), A.M.P (FI23/00265); RETIC REDinREN y RICORS 2040 (RD21/0005/0023; RD24/0004/0020); INNOREN-CM (S2022/BMD7221); UAH (PIUAH23/CCS-010; PIUAH23/CC022; Art.60 LOSU 2022/024